取扱説明書

ReproFF

Cat.# RCHEMD003, 004

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は 2〜8℃で保存して下さい。解凍後は 2 週間を目安に使い切って下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

・フィーダー細胞なしでヒト ES/iPS 細胞の培養が可能です。
・Primate ES Cell Medium と基本構成が同じであるため、オンフィーダー培養からフィーダーレス培養(ReproFF)に簡単に移行できます。
・ヒト ES/iPS 細胞への遺伝子導入・薬剤選択および、分化実験前の未分化維持に特に有効にお使いいただけます。
・ヒト iPS 細胞(Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007)でロット試験済みです。
・浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
・希釈せずに使用できますので、試薬調整の手間が省けます
・血清は不含です。
2-Mercaptoethanol を含みます。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

フィーダーレス培養の特徴

フィーダーレス培養では、オンフィーダー培養に比べ細胞の形態が若干異なりますが問題ございません。また、オンフィーダー培養からフィーダーレス培養に移行しますと、一時的に細胞の状態が悪化する場合がありますが、3〜4 継代で細胞の状態が安定します。増殖速度が若干遅くなりますので 4〜6 日に一度のペースで継代して下さい。

使用方法

ReproFF を用いたヒト ES/iPS 細胞の継代方法

継代方法 (試薬類はあらかじめ室温に戻してご使用下さい。)

必要なもの

・本品:ReproFF に 5ng/mL bFGF(RCHEOT002, 003)を添加したもの(以下、これらを「ReproFF」と総称する)。ヒトES/iPS細胞の培養にはbFGF の添加が必要です。濃度はご使用の細胞株によって異なる場合がございます。
・Dissociation Solution for human ES/iPS Cells(RCHETP002)(以下、これを「剥離液」と総称する)。
・Laminin-5 (RCHEOT004) またはマトリゲル(BD 社)
＊マトリゲルをご使用の場合は、マトリゲルの希釈に DMEM 等の基礎培地(血清不含)、継代操作にセルスクレーパーが必要になります。
・PBS (-):Ca^{++},Mg^{++}-free PBS
・35 mm 細胞培養ディッシュ
・p-1000 ピペットマンとチップ
・その他培養操作に通常必要なもの

A:ディッシュのコーティング

・A1:Laminin-5 をご使用の場合

35mm ディッシュあたり、1〜2μg の Laminin-5 でコートして下さい。均一にディッシュをコートするためにまずは 2μg でのご使用をお勧めいたします。(ご使用の細胞株によって接着具合が異なりますので、様子をみながら使用濃度を調節して下さい。)
A1-1、Laminin-5 を 4℃または氷上で融解しておきます。(手で溶かしたり、室温で溶かさないで下さい。)
A1-2、35mm ディッシュに 1mL の PBS(-)を入れておきます(Laminin-5 の入った vial に絶対に PBS(-)を加えないで下さい。)
A1-3、融解した Laminin-5 を原液のまま直接ディッシュに加え、素早くディッシュを 10 回程度ゆらし、全体に行きわたらせます。(非常に吸着性が強いため、チップへの吸着を避けるため、ピペッティングは行わないで下さい。)
A1-4、4℃で一晩、または 37℃で 2 時間インキュベートしコーティングします。
A1-5、すぐに使用しない場合はパラフィルムでシールし、4℃で保存できます。(1 週間を目安にご使用下さい。)

・A2:マトリゲルをご使用の場合

・マトリゲルの分注
A2-1、マトリゲルを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。泡立たせないようにボトルを回して撹拌します。温度が上がるとゲル化するので注意して下さい。
A2-2、15mL チューブとチップを十分に冷やしておきます。
A2-3、操作 A2-1 で解凍したマトリゲルをゲル化させないように氷上で、15mL チューブに 300μL ずつ分注します。
A2-4、パラフィルムでシールし、-80℃で保存します。

・コーティング
A2-5、分注したチューブを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。
A2-6、粘性はあるがゲル状のものが見えないことを確認し、DMEM 等の基礎培地(血清不含)を 8.7mL 加え 30 倍希釈します。泡立てないようにゆっくりピペッティングします。
A2-7、30 倍希釈したマトリゲルを 35mm 細胞培養ディッシュに 0.75ml 加え、ピペットマンで全体に行き渡らせます。
A2-8、パラフィルム等でシールし、室温で 3 時間程静置します。すぐに使用しない場合はそのまま 4℃で保存できます。

B:オンフィーダー培養→フィーダーレス培養への継代方法

(以下の試薬用量は、35 mm ディッシュの場合です。)
B1、あらかじめ操作 A でコーティングしたディッシュから余分な液体を取り除き、ReproFF を 1.5 mL 加えておきます。Laminin-5 をご使用の場合は、PBS(-)で 2 回洗浄した後、ReproFF を加えます。(ディッシュを乾燥させると活性が低下してしまうので、コーティング表面が乾かないようにして下さい。)
B2、フィーダー細胞上で培養しているヒト ES/iPS 細胞(35mm ディッシュ)を用意します。
B3、ヒト ES/iPS 細胞のディッシュから ES Medium を除き、PBS(-) 1 mL で細胞を洗います。
B4、剥離液 1 mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 5 分程加温します。
B5、細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがフィーダー細胞から剥がれかけている状態になっている事を確認します。注 1)
B6、新しい ReproFF で ES/iPS 細胞とフィーダー細胞を全て剥がし 15

mL チューブに回収します。注 2）
B7、約 170×g (1,000 rpm)、5 分間、室温で遠心し、上清をできるだけ除きます。
B8、沈殿した細胞に新しい ReproFF を 1mL 加え、p-1000 ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりとピペッティングし、コロニーの大きさを 200～300μm 程度(オンフィーダー培養の継代より大きめ(図 1 参照))に崩します。注 3)
B9、操作 B1 で準備したディッシュ上に細胞懸濁液を半量程度、継代して下さい。継代の希釈割合は、ご使用の細胞株の増殖速度、Laminin-5 のコーティング濃度等によって異なります。
B10、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、CO_2 インキュベーターで一晩培養します。
翌日から毎日 1 回、ReproFF で培地交換を行って下さい。

C:フィーダーレス培養→フィーダーレス培養への継代方法

C1、あらかじめ準備しておいた Laminin-5(またはマトリゲル)コート済みディッシュから余分な液体を取り除き、ReproFF を 1.5 mL 加えておきます。Laminin-5 をご使用の場合は、PBS(-)で 2 回洗浄した後、ReproFF を加えます。(ディッシュを乾燥させると活性が低下してしまうので、コーティング表面が乾かないようにして下さい。)
C2、フィーダーレス培養中のディッシュから ReproFF を除き、PBS(-) 1mL で細胞を洗います。
C3、剥離液をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 5 分程度加温します。
C4、新しい ReproFF で 15mL チューブに細胞を回収し、約 170×g (1,000 rpm)、5 分間、室温で遠心します。マトリゲルコートディッシュをご使用の場合は、細胞がはがれにくい場合がありますので、その際はセルスクレーパーで細胞を回収して下さい。
C5、上清を除き、新しい ReproFF を 1 mL 加え、p-1000 ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりとピペッティングし、コロニーの大きさを 200～300μm 程度(オンフィーダー培養の継代より大きめ)に崩します。注 4)
C6、操作 B1 で準備したディッシュに細胞懸濁液を半量程度、継代します。オンフィーダー培養に比べ細胞の接着率が若干低いため、少し高めの濃度で継代して下さい。継代の希釈割合は、ご使用の細胞株の増殖速度、Laminin-5 のコーティング濃度等によって異なります。
C7、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、5%CO_2 インキュベータで一晩培養します。
翌日から毎日 1 回、ReproFF で培地交換を行って下さい。

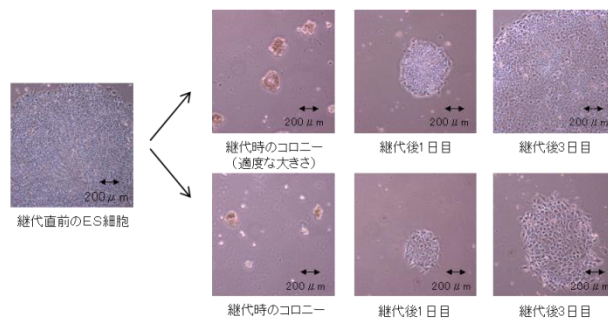
ご注意）

1） 細胞の剥がれ方は、フィーダー細胞の密度や ES/iPS 細胞の状態によって異なることがありますが、基本的に ES/iPS 細胞とフィーダー細胞がともに剥がれます。
2）部分的に ES/iPS 細胞のコロニーがフィーダー細胞の塊に取り込まれる場合があります。その場合は無理にピペッティングせず、その塊を取り除いて、残りの ES/iPS 細胞コロニーで継代を行って下さい。
3） 継代時は古いフィーダー細胞も持ち越されます。フィーダー細胞を持ち越したくない場合は、細胞を懸濁後 5～10 分程静置して下さい。ES/iPS 細胞のコロニーが先に沈み、上清には細かくなったフィーダー細胞が残っているので、この上清を取り除くことで古いフィーダー細胞の大部分を取り除くことができます。

関連製品

RCHEMD001	Primate ES Cell medium
RCHEMD005	Repro Stem
RCHETP002	Dissociation Solution for human ES/iPS Cells
RCHEFM001	Freezing Medium for human ES/iPS Cells
RCHEOT001	ReproCoat
RCHEOT002, 003	bFGF
RCHEOT004	Lamimin-5
RCHEFC001	Feeder Cells (SL10)
RCHEFC003	Feeder Cells (MEF)

本製品の試験成績表は下記 URL よりご覧下さい。

株式会社リプロセル
http://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com

(図1) 継代時のコロニーを小さく崩し過ぎると(下段)、接着率が悪くなったり、コロニー内の細胞が密になりにくい傾向がみられるため、継代時は大きめのコロニー(上段)で継代するようにしてください。